مقاله تحقیقی

اثر دوزهای مختلف LIF بر میزان IVM و انبساط کومولوسی (Cumulus expansion) در اووسیت‌های موش

آمنه محمدی روشنده .Ph.D*، حسن حاج حسینی.M.Sc*، بهروز نیک نفس.Ph.D *، راحله حلبیان .M.Sc **

مهدی روحبخش .M.Sc، منیره دانشور***

*گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

** مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون تهران، ایران

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۸، تاریخ پذیرش: خردادماه ۸۸

چکیده

هدف بررسی آثار دوزهای مختلف فاکتور مهاری لوسمی روی تکامل GVBD (Germinal vesicle breackdown)، MII (Metaphase II) و میزان Expansion

مواد و روش‌ها: موش‌های نابالغ توسط HMG تحریک تخمک گذاری شده و تخمک‌های GV از تخمدان‌ها بعد از ٤٨ ساعت جمع‌آوری شدند. تخمک‌های GV در محیط TCM199 با فاکتور مهاری لوسمی IU /ml ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ کشت داده شدند. انبساط کومولوسی (Cumulus expansion) توسط دو نفر ارزیابی شد و سپس تعداد تخمک‌های MII شمارش شدند. برای برهنه کردن (denude) اووسیت‌ها از هیالورونیداز استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج تحقیق نشان داد که میزان GVBD و MII در گروه‌های حاوی فاکتور مهاری لوسمی در مقایسه با گروه کنترل دارای افزایش است. میزان تکامل MII با غلظت IU /ml ۱۰۰۰ فاکتور مهاری لوسمی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($p<0.05$). Cumulus expansion در گروهی با IU /ml ۱۰۰۰ فاکتور مهاری لوسمی در مقایسه با گروه کنترل بهبود پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که فاکتور مهاری لوسمی می‌تواند میزان IVM را به‌صورت وابسته به دوز افزایش دهد. همچنین cumulus expansion در گروه حاوی فاکتور مهاری لوسمی بهبود پیدا کرده و کیفیت تخمک افزایش یافته که آن هم وابسته به دوز بوده است.

کلید واژه‌ها: فاکتور مهاری لوسمی، انبساط کومولوسی، تکوین آزمایشگاهی تخمک، لقاح آزمایشگاهی، موش

مقدمه

رشد و نمو تخمک در خارج از بدن (IVM: In vitro maturation of oocyte) یکی از روش‌هایی است که اخیراً در تکنولوژی کمکی تولید مثل (ART: assisted reproductive technology) استفاده می‌شود. این روش می‌تواند در تولید جنین در بیمارانی که دچار تخمدان حساس به هورمون‌های تحریک کننده تخمک و

آدرس مکاتبه: ایران، تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی: ١٤٧٦٦-٥١٦٦٦ E-mail:dinachal@yahoo.com

همین‌طور برای بیمارانی با تخمدان پلی‌کیستیک استفاده شود. در خانم‌هایی که دچار سرطان شده و تخمدان‌های آن‌ها برداشته شده هم می‌توان از این روش استفاده کرد [۱و۲].

با تمام مزایایی که این روش نسبت به روش‌های معمول در درمانگاه‌های ناباروی دارد، اما هنوز هم به‌طورروزمره در مراکز ناباروری مورد استفاده قرار نمی‌گیرد و علت آن پایین بودن میزان جنین‌ها و بارداری است. یکی از مهم‌ترین دلایل پایین بودن میزان جنین‌ها تکامل نامناسب هسته و سیتوپلاسم تخمک در محیط‌های کشت است. محیط‌های کشت نتوانسته‌اند شرایط مناسب مانند داخل بدن را برای رشد تخمک ایجاد کرده و میزان رشد آن دچار اختلال می‌شود [۳].

استراتژی‌های موجود برای بهبود و افزایش میزان تکامل اووسیت، اصلاح ترکیبات محیط کشت و افزودن مواد جدید در محیط‌های کشت است. تحقیقات زیادی وجود دارد که نقش موادی همچون پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، هورمون‌ها و مواد آنتی‌اکسیدان را روی تکامل تخمک و جنین و بهبود تکامل هسته و سیتوپلاسم بررسی کرده اند [٤ و٥].

فاکتور مهار کننده لوسمی برای اولین بار در سال ۱۹۸٦ کشف شد. این فاکتور یک سیتوکین از خانواده اینترلوکین-٦ است و روی انواع مختلف سلول‌ها عمل می‌کند. فاکتور مهار کننده لوسمی (LIF: Leuckemia inhibitory factor) یک سیتوکین با ترکیب گلیکوپروتئینی است که دارای وزن مولکولی ٦۷-۳۸ کیلودالتون است [٦]. نشان داده شده است که این ترکیب نقش مهمی در جایگزینی جنین جوندگان داشته باشد [۷ و۸]. اضافه کردن فاکتور مهاری لوسمی به محیط کشت جنین گاومیش در چند مطالعه نشان داد که نتایج حاصل یکسان نیستند [۹]. به‌طور مثال اضافه کردن ۵۰۰IU/ml در مرحله مورولا یا مراحل اولیه بلاستوسیست منجر به افزایش تعداد بلاستوسیست‌ها بدون تغییر در میزان هچینگ (Hatching) شده است، در حالی‌که افزودن IU/ml ۵۰۰ در تحقیق دیگر، تغییری در میزان تکامل بلاستوسیست‌ها نداشته اما در تعداد سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست نقش داشته است [۱۰]. فاکتور مهاری لوکمیا اثر خود را از طریق گیرنده خود اعمال می‌کند. فاکتور مهاری لوسمی عاملی است که به‌طور اختصاصی با گیرنده GP130 عمل می‌کند و در تعدادی از سیستم‌های تکاملی تأثیرگذار است. این گیرنده روی بافت‌های مختلف سیستم تناسلی جنس مونث از جمله اووسیت نشان داده شده است [۱۱].

محققان نشان داده شده‌اند که فاکتور مهاری لوسمی در مایع فولیکولی وجود دارد و به‌نظر می‌رسد که در راستای رشد فولیکول میزان آن هم افزایش پیدا می‌کند. به‌نظر می‌رسد که فاکتور مهاری لوسمی روی سلول‌های زایگر مقدماتی در محیط داخل بدن(*In vivo*) و محیط کشت (*In vitro*) نقش داشته باشد اما نقش آن در تکامل اووسیت توضیح داده نشده است. در تحقیقی نشان داده شد که استفاده از IU/m ۱۰۰۰ فاکتور مهاری لوسمی، میزان تکامل اووسیت‌های ژرمینال وزیکل را افزایش می‌دهد [۱۲و ۱۳].

یکی از مواردی که در مقوله رشد آزمایشگاهی تخمک مهم است تکامل همزمان سیتوپلاسم و هسته است. Cumulus expansion شاخصی است که میزان آن می‌تواند بیان‌کننده کیفیت تخمک تلقی شود [١٤]. با توجه به اینکه کیفیت تخمک به‌دست آمده نقش بسیار زیادی در مراحل بعدی مانند IVF دارد در تحقیق حاضر اثر فاکتور مهاری لوسمی بر میزان تکامل GVBD و MII و Cumulus expansion بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر از موش‌های ماده سوری نابالغ ۵ هفته‌ای استفاده شد. موش‌ها از حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تهیه شده و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آسان به غذا و آب نگه داشته شدند.

تحریک تخمک گذاری: برای تحریک تخمک گذاری از HMG به میزان ۷/۵ واحد برای هر موش و به‌صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد.

گرفتن تخمک GV: بعد از ٤٨ ساعت از تزریق HMG ، موش‌ها به‌صورت جابه‌جایی گردنی قربانی شده و تخمدان آن‌ها برداشته شد و در داخل محیط کشت TCM199 قرار گرفت. با استفاده از دو سوزن انسولین تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکل از تخمدان گرفته شده و بعد از ۳ مرحله شستشو به قطرات ۵۰ میکرولیتری محیط کشت انتقال داده شدند.

کشت تخمک‌ها: تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکل در محیط کشت TCM199 با مقادیر مقادیر مختلف (کنترل) و ۱۰۰ IU/ml، ۵۰۰ IU/ml و ۱۰۰۰ IU/ml فاکتور مهاری لوسمی همراه با سدیم پیرووات، و FSH در انکوباتوربا 5Co2 درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

ارزیابی تخمک‌ها: ۲۰ ساعت بعد از کشت، تخمک‌ها بررسی شده و Cumulus expansion توسط ۲ نفر ارزیابی شد. سپس تخمک‌ها با استفاده از هیالورونیداز برهنه شده و تعداد تخمک‌های مرحله MII و GVBD ارزیابی شد.

داده ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS Ver.11 و مقایسه بین گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه بررسی شد.

یافته‌ها

اثر مقادیر مختلف فاکتور مهاری لوسمی بر میزان تشکیل تخمک‌های GVBD و MII

جدول ۱ درصد تشکیل اووسیت‌های مرحله متافازII را در غلظت‌های مختلف فاکتور مهاری لوسمی نشان می‌دهد. نتایج حاصل از کشت تخمک‌های مرحله ژرمینال وزیکل در محیط کشت با مقادیر مختلف فاکتور مهاری لوسمی نشان می‌دهد که در غلظت ۱۰۰۰ IU/ml میزان تکامل اووسیت‌ها به مرحله متافاز II نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بوده و نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است ($p<0.05$). در محیط با مقدار ۵۰۰ IU/ml، تخمک‌های ژرمینال وزیکل به میزان ۵۰ درصد به متافاز II تبدیل شدند که نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده اما از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p>0.05$). در گروه با غلظت ۱۰۰ IU/ml، پایین‌ترین میزان تکامل تخمک‌های متافاز II به‌دست آمد که در آن میزان درصد تکامل نسبت به گروه کنترل کمتر بوده اما این کاهش معنی‌دار نبود ($p>0.05$).

جدول ۱ . میزان تکوین تخمک های متافاز II را در گروه های مختلف

تکوین / گروه ها	درصد تکوین متافازII	تعداد تخمک ها
گروه کنترل	٪۵۳	۱۷۳/۹۲
گروه 100IU/ml	٪٦۰	۹۰/٥٤
گروه 500 IU/ml	٪٥٥	۱۱۱/٦۱
گروه1000 IU/ml	٪٨٤/٦*	۱۳۰/۱۰۹

*: $P<0.05$

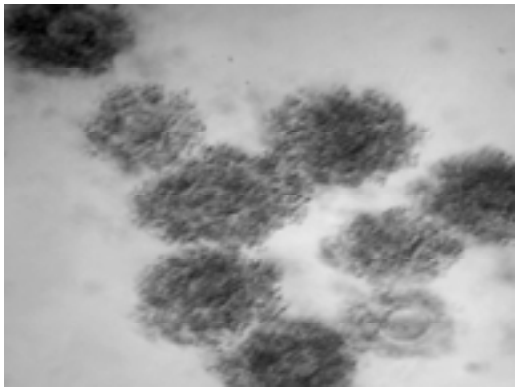
اثر مقادیر مختلف فاکتور مهاری لوسمی بر میزان expansion

بررسی‌های حاصل از میزان expansion در گروه‌های مختلف نشان داد که فاکتور مهاری لوسمی با غلظت ۱۰۰۰ IU/ml میزان expansion را بهبود بخشید که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بوده است ($p<0.05$). در گروه‌های دیگر با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰ IU/mlهم میزان expansion نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده است. ارزیابی expansion با ۲ نفر انجام گرفته و به دو درجه + و ++ تقسیم‌بندی شده است (شکل‌های ۱و ۲).

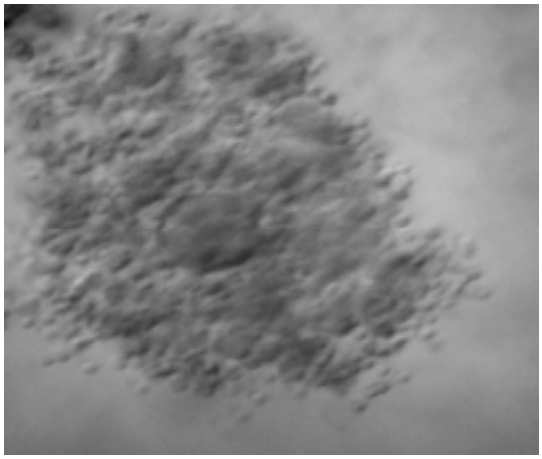
جدول ۲. میزان درصد expansion در گروه‌های مختلف

میزان expansion / گروه‌ها	گروه کنترل	گروه ۱۰۰IU/ml	گروه۵۰۰IU/ml	گروه ۱۰۰۰IU/ml
+	%۵۱/۲	٪ ۵۰/٤۸	٪ ۸۱/۱	٪ ۲۲,۰۵%
	۱۰۳/۲۰۰±۳	۵۲/۱۰۳± ٤,٦	۸۹/۱۱۱±٤/۱۱	۳۰/۱۳٦±۳/۵
++	٪۵/۵	٪۱۱/٦۵	٪۱۳/۵۱	٪۵۱/٤
	۱۱/۲۰۰	۱۲/۱۰۳	۱۵/۱۱۱	۷۰/۱۳٦

در گروه با IU/ ml ۵۰۰ میزان expansion در درجه + در حدود ۹۰ درصد بوده است؛ در حالی‌که میزان expansion در گروه با IU/ml ۱۰۰۰ در درجه ++ در حدود ٦۰ درصد بوده است که میزان expansion مطلوب را نشان می‌دهد (شکل ۱). میزان درصد expansion در جدول ۲ آمده است.



شکل ۱. اووسیت‌های expand شده یک + را نشان می‌دهد (بزرگنمایی: ۵۰۰×).



شکل ۲. اووسیت‌های expand شده دو مثبت را نشان می دهد (بزرگنمایی: ۱۰۰۰×).

بحث

نتایج حاصل از آزمایش‌های حاضر نشان داد که فاکتور مهاری لوسمی قادر به افزایش میزان تکامل اووسیت‌های مرحله ژرمینال وزیکل به متافاز II است. این افزایش در دوز IU/ ml ۱۰۰۰ بیشتر بوده و نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

محققان نشان داده اند که فاکتور مهاری لوسمی در تکامل بلاستوسیست‌ها نقش دارد. همچنین نشان داده شده است که در تخمک‌گذاری و تکامل جنین و جایگزینی نقش دارد [۱۵].

نقش فاکتور مهاری لوسمی در بلوغ ازمایشگاهی تخمک هنوز به‌طور کامل مشخص نیست. به این منظور در تحقیق حاضر آثار دوزهای مختلف فاکتور مهاری لوسمی بر میزان GVBD و MII مطالعه شد. نشان داده شده است که فاکتور مهاری لوسمی در محیط *In vitro* موجب افزایش میزان تکامل جنین‌ها در انسان، جوندگان و گاومیش می‌شود (۱٤). در تحقیقی که توسط دماتوس (De matos) و همکارانش انجام شده است میزان ng/ml ۱۰۰۰ فاکتور مهاری لوسمی، اثر مثبتی در میزان افزایش جنین‌های دو سلولی، بلاستوسیست و تولدهای زنده داشته است [۱٤].

فاکتور مهاری لوسمی از طریق بیان ژن‌های KL (Kit ligand) و FGF می‌تواند درتکثیر سلول‌های گرانولوزا و تکا تأثیر

داشته باشد و فاکتور مهاری لوسمی به‌طور مستقیم نمی‌تواند بر تکثیر این سلول ها نقش داشته باشد. در فولیکول پستانداران دو رویداد بزرگ رخ می‌دهد. یکی اینکه اووسیت تقسیم میوز خود را از سر می‌گیرد و دیگر اینکه سلول‌های کومولوس که اووسیت را در بر گرفته‌اند عمل expansion را انجام می‌دهند [۱۵].

فاکتور مهاری لوسمی طی رشد فولیکولی وجود دارد و به‌طور قابل ملاحظه‌ای در هنگام تخمک‌گذاری زیاد می‌شود. Expansion سلول های کومولوس بسته به ماده زمینه‌ای است که سلول‌های گرانولوزا در آن حرکت می‌کنند و حداقل دارای ۳ ترکیب است. این ۳ ترکیب شامل اسید هیالورونیک و حداقل دو پروتئین متصل شونده به اسید هیالورونیک است [۱۶].

سو (Su) و همکارانش ثابت کرده اند که germinal vesicle breakdown به فعالیت MAPK در سلول های کومولوس نیاز دارد [۱۷]. به علاوه همان محققین نتیجه‌گیری کرده‌اند که القای expansion کومولوس‌ها نیازمند افزایش cAMP القا شده توسط FSH هستند [۱۸].

در تحقیق حاضر expansion کومولوس‌ها با به‌کارگیری فاکتور مهاری لوسمی در محیط کشت افزایش پیدا کرد و این افزایش با میزان دوز به‌کار گرفته متفاوت بود. القای سلول‌ها با فاکتور مهاری لوسمی و دیگر سیتوکین‌ها آبشار Jak-STAT و مسیر Ras-MAPK را درگیر می‌کند. بنابراین در expansion ناشی از فاکتور مهاری لوسمی فعالیت MAPK دخیل است [۱۸].

اضافه کردن فاکتور مهاری لوسمی به محیط کشت حاوی اووسیت‌های گوسفند موجب بهبود تکامل تخمک‌ها و جنین‌های این حیوان شده است [۱۹].

بررسی حاضر نشان داد که فاکتور مهاری لوسمی نقش مهمی در بلوغ آزمایشگاهی اووسیت داشته است. همین‌طور القای expansion کومولوس‌ها با وجود فاکتور مهاری لوسمی و در دوز ۱۰۰۰ بیشترین میزان بوده است. با این وجود مکانسیم عمل فاکتور مهاری لوسمی طی IVM و گیرنده‌های درگیر در آن هنوز به‌طور کامل بررسی نشده است.

.

References

1. **Trounson A, Anderiesz C, Jones G.** Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001; 121: 51-75.
2. **Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH**. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. Fertil Steril 2000; 746: 1153-8.
3. **Ravin dranatha BM, Nandi S, Raghu HM, Reddy SM**. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes: Effects of storage of ovaries, IVM temperatures, storage of processed sperm and fertilization media. Reprod Domest Anim 2003; 38: 21-6 .
4. **Mohammadi-Roushandeh A, Noori-Mooghahi MA, Pasbakhsh P, Abddvahabi A, Akbari1 A, Shokrgozar A, Sobhani A**. Effect of cysteamine on the rate of in vitromaturation of oocytes in two media. Acta Medica Iranica 2006; 44: 167-71.
5. **Mohammadi Roushandeh A, Pasbakhsh P, Alizadeh Z, Habibi Roudkenar** .In vitro maturation media, cysteamine concentration and glutathione level affect blstocysts development in mouseIranian J Reprod Med 2007; 5: 159-63.
6. **Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Bosch P, Hollet BR, Lott JD, Brackett BG**. Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced in vitro under chemically defined conditions. Theriogenology 2003; 59:1751-63.
7. **Rizos D, Gutie´rrez-Ada´n A, Pe´rez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P**. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development,

Cryotolerance, and Messenger RNA Expression1D. Biol Reprod 2003; 68: 236–43.

8. **Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F,et al.** Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. Nature 1992; 3: 76-9
9. **Fedorcsa´kP, Storeng R**. Effect of leptin and leukemia inhibitory factor on preimplantation development andSTAT3 signaling of mouse embryos in vitro. Biol Reprod 2003; 69: 1531–8.
10. **Han YM, Lee ES, Mogoe T, Lee KK, Fukui Y**. Effect of human leukemia inhibitory factor on in vitro development of IVF-derived bovine morulae and blastocysts. Theriogenology 1995; 44: 507-16.
11. **Ni H, Ding NZ, Harper MJ, Yang ZM**. Expression of leukemia inhibitory factor receptor and gp130 in mouse uterus during early pregnancy. Mol Reprod Dev 2002; 63: 143-50.
12. **Hsieh YY, Chang CC, Tsai HD, Lin CS.** Leukemia inhibitory factor in follicular fluid is not related to the number and quality of embryos as well as implantation and pregnancy rates. Biochem Genet 2005; 43: 501-6.
13. **Skinner MK**. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum Reprod Update. 2005; 11:461-71.
14. **De Matos DG, Miller K, Scott R, Tran CA, Kagan D, Nataraja SG, et al.** Leukemia inhibitory factor induces cumulus expansion in immature human and mouse oocytes and improves mouse two-cell rate and delivery rates when it is present during mouse in vitro oocyte maturation. Fertil Steril 2008; 90: 2367-75.
15. **Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK**. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. Mol Cell Endocrinol 2002; 188: 65-/73.
16. **Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC**. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. Hum Reprod Update1999; 5:293–301.
17. **Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM**. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte–cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte–granulosa cell regulatory loop. Dev Biol 2004; 276: 64–73.
18. **Auernhammer CJ, Melmed S**. Leukemia-inhibitory factor—neuroimmune modulator of endocrine function. Endocr Rev 2000; 21: 313–45.
19. **Ptak G, Lopes F, Matsukawa K, Tischner M, Loi P.** Leukaemia inhibitory factor enhances sheep fertilization in vitro via an influence on the oocyte. Theriogenology 2006; 65:1891-9.

Original Article

Effects of Different Doses of LIF on IVM Rate and Cumulus Expansion in Mouse Oocytes

Mohammadi Roushandeh A., Ph.D.*, Haji Hosseinlou H., M.Sc., Niknafs B., Ph.D., Halabian R., M.Sc., Rouhbakhsh M., M.sc, Daneshvar M.

**: P.O.Box:51666-14766, Anatomy Department, Medicine Faculty, Tabriz Medical University, Tabriz, Iran*

Abstract

Purpose: The aim of this research was to study the effects of different doses of LIF on GVBD and MII development rate and cumulus expansion.

Materials and Methods: Immature mice superovulated with HMG and GV oocytes obtained from ovary 48 hours later. The GV oocytes were cultured in TCM199 with 100, 500 and 1000 IU /ml LIF. Cumulus expansions were evaluated with two examiners and numbers of MII oocytes were recorded. For denuding the oocytes hyaloronidase was used.

Results: Our results showed that the rate of GVBD and MII development increased in groups with LIF compared with control group. Rate of MII development with 1000 IU/ml LIF was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). Cumulus expansion in group with 1000 IU/ml LIF improved significantly compared with control group ($p<0.05$).

Conclusion: Our results showed that LIF could improve IVM rate in dose dependant. Also cumulus expansion improved in group with LIF and increased oocyte quality.

Key words: LIF, IVM, IVF, Cumulus expansion, Mouse